

## Laser-scanning microscope with an AOTF

Patent Number: DE19827140

Publication date: 1999-12-23

Inventor(s): SIMON ULRICH (DE); WILHELM STEFAN (DE)

Applicant(s):: ZEISS CARL JENA GMBH (DE)

Requested Patent:  DE19827140

Application Number: DE19981027140 19980618

Priority Number(s): DE19981027140 19980618

IPC Classification: G02B21/00

EC Classification: G02B21/00M4

Equivalents:  JP2000047117 (JP00047117)

### Abstract

A laser-scanning microscope has an AOTF in a laser input beam coupler, with a temperature sensor arranged adjacent to the AOTF and device for heating and cooling of the AOTF.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

JC978 U.S. PRO  
09/878842



06/11/01



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑰ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 198 27 140 A 1

⑯ Int. Cl. 6:  
G 02 B 21/00

⑲ Aktenzeichen: 198 27 140.9  
⑳ Anmeldetag: 18. 6. 98  
㉑ Offenlegungstag: 23. 12. 99

㉒ Anmelder:  
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

㉓ Erfinder:  
Simon, Ulrich, Dr., 07751 Rothenstein, DE; Wilhelm,  
Stefan, Dipl.-Ing., 07745 Jena, DE  
  
㉔ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
zu ziehende Druckschriften:  
US 45 36 062  
EP 06 95 963 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- ㉕ Laser-Scanning-Mikroskop mit AOTF  
㉖ Laser-Scanning-Mikroskop mit einem AOTF im Laser-  
Einkopplungsstrahlengang, wobei in der Umgebung des  
AOTF oder in dessen Nähe oder mit diesem verbunden  
ein Temperaturfühler vorgesehen ist,  
und eine Heizung oder Kühlung des AOTF und/oder sei-  
ner Umgebung erfolgt.

## Beschreibung

Es ist bereits bekannt, in einem Laser-Scanning-Mikroskop Laser unterschiedlicher Wellenlängen über Strahleiter zusammenzuführen und über einen AOTF mit einem über Brechungsindexvariation realisierten Gitter, dessen Gitterkonstante entsprechend seiner hochfrequenten Ansteuerung variabel ist, in eine Lichtleitfaser einzukoppeln.

Die durch den AOTF in erster Ordnung gebeugte Wellenlänge sowie die Intensität werden durch Ansteuerung des AOTF eingestellt, die Intensität über die Amplitude der Schallwelle und die Wellenlänge über die Frequenz der Schallwelle.

Die Verwendung von Akustoptik zur Linienselektion und Abschwächung von Laserlinien in einem modularen Aufbau hat den Nachteil, daß die Transmissionseigenschaften der Akustoptischen Einheit stark temperaturabhängig sind.

Dies ist dadurch zu erklären, daß es mit Änderung der Temperatur zu einer Änderung der Schallgeschwindigkeit im Kristallmaterial kommt, die sich indirekt in einer Abweichung von der optimalen Frequenz und damit in einer Abnahme der Beugungseffizienz bemerkbar macht. Eine Frequenzverschiebung von ca. 16 KHz/°C wurde ermittelt.

Das führt zu Intensitätsverlusten und zu möglichen Intensitätsmodulationen im gescannten Bild.

Wurde der AOTF beispielsweise auf 21°C abgestimmt, fällt bei einem Temperaturwechsel von 21°C auf 35°C die transmittierte Leistung ohne Korrekturmaßnahmen auf ca. 5% des Ausgangswertes ab. Selbst bei einer Temperaturänderung von nur 4°C kommt es zu einem Leistungsabfall um ca. 50%.

Eine akzeptable Performance des Laser-Scanning-Mikroskopes ist nur zu gewährleisten, wenn die Temperaturschwankungen auf +/- 1°C eingegrenzt werden können.

Dies ist jedoch in der Praxis durch die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten des Laser-Scanning-Mikroskopes kaum möglich.

Raumtemperaturen > 30°C werden darüber hinaus in vielen Labors schnell erreicht.

Die Erfindung hat daher die Aufgabe, trotz ungewisser und nicht konstanter Aufstellbedingungen des LSM die Stabilität der Laserleistung für alle benötigten Wellenlängen in ultravioletten (351 nm, 364 nm) und sichtbaren Spektralbereich (450 nm–650 nm) zu gewährleisten.

Die Aufgabe wird erfundengemäß durch die Merkmale der unabhängigen Patentansprüche gelöst.

Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

Vorteilhaft kann die AOTF Frequenz über die Ansteuerung des AOTF durch eine Treiberschnittstelle in Abhängigkeit von der Temperatur gesteuert werden.

Die Temperaturerfassung kann hierzu in unmittelbarer Nähe des AOTF, beispielsweise direkt an seinem Gehäuse erfolgen.

Falls eine Temperaturabweichung von größer +/- 1°C von einem vorgegebenen Referenzwert festgestellt wird, erfolgt eine automatische Frequenznachstellung innerhalb eines vorgegebenen Frequenzfensters, vorzugsweise +/- 200 KHz um die bei dem Referenzwert (Temperatur) festgelegte Frequenz. Die Frequenz kann auch anhand vorher aufgenommener und tabellarisch abgespeicherter temperaturabhängiger Frequenzwerte eingestellt werden.

Die Temperaturabweichung kann auch durch eine Intensitäts erhöhung ausgeglichen werden, die den Effizienzverlust des AOTF ausgleicht.

Das dargestellte LSM realisiert auf dem VIS Lasermodul im Extremfall die Vereinigung von einem Ar Laser (458 nm, 488 nm, 514 nm) bzw. ArKr Laser (488 nm, 568 nm) mit je-

weils zwei HeNe-Lasern. Die Laserlinien werden über Dicroite und Spiegel auf eine gemeinsame Achse vereinigt, in einem AOTF selektiert und die erste Beugungsordnung des VIS AOTF wird in eine Single Mode Faser gekoppelt. Auf dem UV Lasermodul erfolgt die Selektion der Laserlinien 351 nm und 364 nm über einen UV-AOTF; die erste Beugungsordnung wird ebenfalls in eine Single Mode Faser eingekoppelt.

Die Erfindung wird nachstehend anhand der schematischen Darstellungen näher erläutert. Es zeigen:

**Fig. 1:** Den Strahlengang eines Laser-Scanning-Mikroskopes;

**Fig. 2:** Den beheizbaren AOTF in einem seitlichen Teilschnitt und in räumlicher Darstellung.

In Fig. 1 sind schematisch eine Mikroskopeinheit M und ein Scankopf S dargestellt, die eine gemeinsame optische Schnittstelle über eine Zwischenabbildung Z gemäß Fig. 2 ausweisen.

Der Scankopf S kann sowohl an den Phototubus eines aufrechten Mikroskopes sowie auch an einen seitlichen Ausgang eines inversen Mikroskopes.

In Fig. 1 ist ein zwischen Auflichtscan und Durchlichtscan mittels eines schwenkbaren Spiegels 14 umschaltbarer mikroskopischer Strahlengang dargestellt, mit Lichtquelle

25 1, Beleuchtungsoptik 2, Strahleiter 3, Objektiv 4, Probe 5, Kondensor 5, Lichtquelle 7, Empfängeranordnung 8, einer ersten Tubuslinse 9, einem Beobachtungsstrahlengang mit einer zweiten Tubuslinse 10 und einem Okular 11 sowie einem Strahleiter zur Einkopplung des Scanstrahls dargestellt.

Ein Lasermodul 13.1, 13.2 nimmt die Laser auf und ist über Monomode – Lichtleitfasern 14.1, 14.2 mit der Laser-einkoppeleinheit des Scankopfes S verbunden.

Die Einkopplung der Lichtleitfasern 14.1, 14.2 erfolgt mittels einer verschiebblichen Kollimationsoptik 16, auf die noch näher eingegangen wird, sowie Strahlumlenkelementen 17.1, 17.2.

Mittels eines teildurchlässigen Spiegels 18 wird ein Überwachungsstrahlengang in Richtung einer Monitordiode 19, der, vorteilhaft auf einem nicht dargestellten drehbaren Filterrad Linienfilter 21 sowie Neutralfilter 20 vorgeordnet sind, ausgeblendet.

Die eigentliche Scaneinheit besteht aus Scanningobjektiv 22, Scanner 23, Hauptstrahleiter 24 und einer gemeinsamen Abbildungsoptik 25 für Detektionskanäle 26.1–26.4.

Ein Umlenkprisma 27 hinter der Abbildungsoptik 25 spiegelt die vom Objekt 5 kommende Strahlung in Richtung dichroitischer Strahleiter 28 im konvergenten Strahlengang der Abbildungsoptik 25, denen in Richtung und senkrecht zur optischen Achse verstellbare und in ihrem Durchmesser veränderbare Pinholes 29, individuell für jeden Detektionskanal sowie Emissionsfilter 30 und geeignete Empfängerelemente 31 (PMT) nachgeordnet sind.

Die Strahleiter 27, 28 können vorteilhaft, wie in Fig. 5 schematisch dargestellt, als Teillerrad mit mehreren Positionen, motorisch durch Schrittmotoren umschaltbar, ausgebildet sein.

Vorteilhaft erfolgt eine Einkopplung von UV-Strahlung in Glasfaser 14.1, vorzugsweise einer Single-Mode-Glasfaser mittels eines AOTF, als Strahlablenker, d. h. wenn der Strahl nicht auf den Fasereingang fallen soll, wird er mittels des AOTF vom Fasereingang, beispielsweise in Richtung einer nicht dargestellten Lichtfalle, abgelenkt.

Die Einkoppeloptik 33 zur Einkopplung der Laserstrahlung weist zur Einkopplung nicht dargestellte Linsensysteme auf, deren Brennweite durch den Strahlquerschnitt der Laser und die für die optimale Einkopplung erforderliche numerische Apertur festgelegt ist. Im Lasermodul 13.2, sind

Einzel- und Multiwellenlängenlaser vorgesehen, die einzeln oder gemeinsam über einen AOTF in eine oder mehrere Fasern eingekoppelt werden. Weiterhin kann die Einkopplung auch über mehrere Fasern gleichzeitig erfolgen, deren Strahlung mikroskopseitig nach Durchlaufen einer Anpaßoptik durch Farbvereiniger gemischt wird.

Auch die Mischung der Strahlung verschiedener Laser am Fasereingang ist möglich und kann anhand der schematisch dargestellten, auswechselbarer und schaltbarer Teller spiegel 39 erfolgen.

Die aus dem Faserende der Fasern 14,1,2 an der Scaneinheit austretende Laserstrahlung wird mittels der Kollimationsoptik 16 auf einen Unendlichstrahl kollimiert. Das erfolgt vorteilhaft mit einer einzelnen Linse, die durch Verschiebung entlang der optischen Achse mittels einer über eine zentrale Ansteuereinheit 34 ansteuerbare Steuereinheit 37 eine Fokussierungsfunktion hat, indem ihr Abstand zum Ende der Lichtleitfaser 14,1,2 an der Scaneinheit erfundsgemäß veränderbar ist.

Die Monitordiode 19, die auch, hier nicht dargestellt, eine vorgesetzte Fokussierlinse aufweisen kann, wirkt in Verbindung mit einem linien- oder bereichsselektiven Filterrad oder Filterschieber 21, angesteuert von einer Steuereinheit 36, zur permanenten Überwachung der in das Scanmodul eingekoppelten Laserstrahlung, insbesondere um die Leistung in einer bestimmten Laserlinie isoliert zu kontrollieren und gegebenenfalls über den AOTF 32 mittels eines Regel signales der Ansteuereinheit 34 zu stabilisieren. Die Detektion mittels der Monitordiode 19 erfaßt das Laserrauschen und Variationen aufgrund des mechanisch-optischen Übertragungssystems.

Aus der detektierten momentanen Laserleistung kann dabei ein Fehlersignal abgeleitet werden, das on-line direkt auf den Laser oder einen dem Laser nachgeschalteten Intensitätsmodulator (ASOM, AOTF, EOM, Shutter) zwecks der Stabilisierung der in das Scanmodul eingestrahlten Laserleistung zurückwirkt.

Durch die Ansteuerung der Filtereinheit 21 kann somit eine wellenlängenweise Stabilisierung der Intensität und Laserleistungskontrolle erfolgen.

Durch eine Verbindung zur Detektion 31 (PMT) und jeweils zur zentralen Ansteuereinheit kann durch Bildung von Signalquotienten / oder Signalsubtraktion des Detektionssignales und des Monitorsignales der Diode 19 eine Rauschverminderung bewirkt werden, indem das entsprechende Sensorsignal eines Detektionskanals pixelweise als Pixel-Bildinformation auf das Signal der Monitordiode normiert wird (z. B. Division), um auf diese Weise Intensitätsfluktuationen im Bild zu verringern.

Unmittelbar am AOTF ist ein Temperaturfühler TF befestigt, der die Umgebungstemperatur des jeweiligen AOTF erfaßt.

Diese wird zur Ansteuereinheit 34 übermittelt, die einen Rechner enthält, der anhand vorher eingespeicherter Korrekturkurven und einem RS 232-Treiberschaltkreis die AOTF-Frequenz in Abhängigkeit von der Temperatur in einem vorgegebenen Frequenzfenster einstellt und optimiert, das heißt, die durch die Temperaturabweichung aufgetretene Frequenzverschiebung durch Frequenzerhöhung oder Ver ringerung ausgleicht. Dieser Ausgleich kann aber auch automatisch anhand des von der Diode 19 aufgenommenen und an die Ansteuereinheit übermittelten Intensitätswertes der Laserstrahlung erfolgen, indem die Diode 19 mit der Auswerteeinheit verbunden ist und der AOTF-Treiber die Frequenz anhand des aufgenommenen Intensitätssignales der Diode 19 nachstellt, indem die Frequenz vorzugsweise um +/- 200 KHZ variiert wird, bis ein maximales Signal erreicht ist.

Weiterhin besteht eine vorteilhafte Lösung darin, für den AOTF eine separate Heizung oder Kühlung vorzusehen.

Besonders vorteilhaft wird der Kristall auf einen Bereich größer 35°C, beispielsweise 40°C geheizt und innerhalb eines vorgegebenen Fensters konstant gehalten.

Die Laserleistung in der ersten Beugungsordnung bleibt dann über den gesamten Temperaturbereich von beispielsweise 15°C-35°C innerhalb enger Grenzen konstant. Ein Beispiel einer stabilen Temperaturregelung, deren Regelungsschwankungen keine für die LaserScanMikroskopie nachteiligen Effekte zeigen, zeigt Fig. 2.

Auf einem Gehäuseteil G, das Zuführungen Z zur Spannungsversorgung des AOTF aufweist, ist der TeO<sub>2</sub>-Kristall des AOTF angebracht, wobei die durchgehende Laserstrahlung schematisch angedeutet ist.

Zwischen dem Gehäuse G und dem TeO<sub>2</sub>-Kristall befindet sich eine elektrisch beheizbare oder kühlbare Platte P, deren Stromversorgung ST beispielsweise wie dargestellt auf der Außenseite des Gehäuses angebracht sein kann.

Die Stromversorgung ST ist mit einer Regelung verbunden, die mit einem Temperaturfühler verbunden ist, der direkt am TeO<sub>2</sub> Kristall oder an der Stromversorgung ST angeordnet sein kann.

Die Regelung kann Teil der Stromversorgung ST sein, aber auch über die Ansteuereinheit 34 erfolgen.

Der Temperaturfühler TF kann auch, wie in Fig. 1 bereits dargestellt, am Gehäuse angebracht sein und mit der Auswerteeinheit 34 verbunden sein, die die Temperaturänderung erfaßt und den AOTF entsprechend ansteuert.

#### Patentansprüche

1. Laser Scanning-Mikroskop mit einem AOTF im Laser-Einkopplungsstrahlengang, wobei in der Umgebung des AOTF oder in dessen Nähe oder mit diesem verbunden ein Temperaturfühler vorgesehen ist.

2. Laser-Scanning-Mikroskop mit einem AOTF im Laser-Einkopplungsstrahlengang, wobei eine Heizung oder Kühlung des AOTF und/ oder seiner Umgebung erfolgt.

3. Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 2, wobei die Heizung oder Kühlung auf einen konstanten Wert geregelt erfolgt.

4. Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 3, wobei die Heizung auf einen Wert oberhalb erwarteter Laborbedingungen erfolgt.

5. Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 4, wobei der Wert oberhalb 35 Grad Celsius liegt.

6. Laser-Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 2-5, wobei in der Umgebung des AOTF oder in dessen Nähe oder mit diesem verbunden ein Temperaturfühler vorgesehen ist.

7. Laser-Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 2-6, wobei der Temperaturfühler zur Regelung der Temperatur mit der Heizung oder Kühlung über eine elektronische Steuerung verbunden ist.

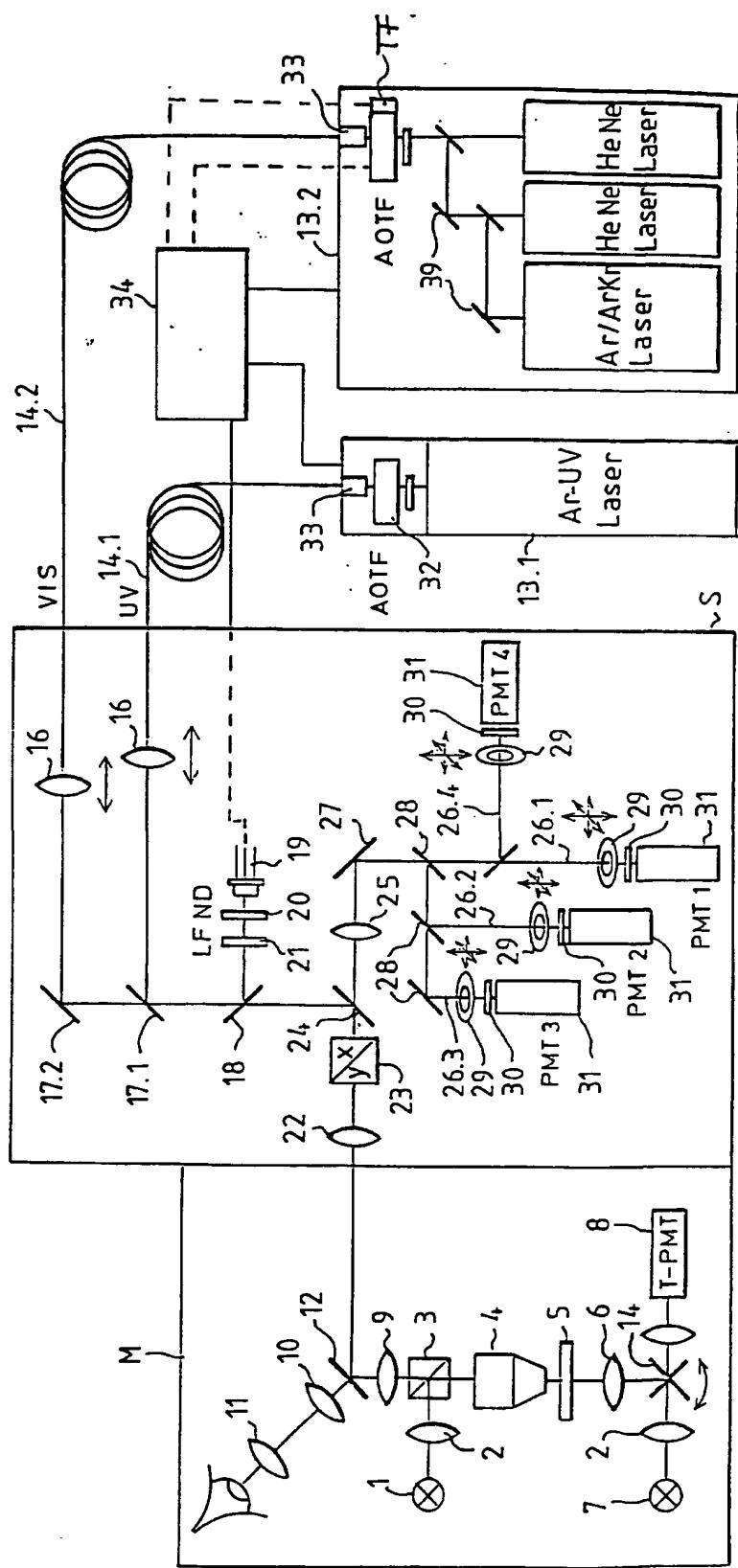
8. Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 1, wobei der Temperaturfühler mit einer Ansteuereinheit für den AOTF verbunden ist.

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

**- Leerseite -**

FIG. 1

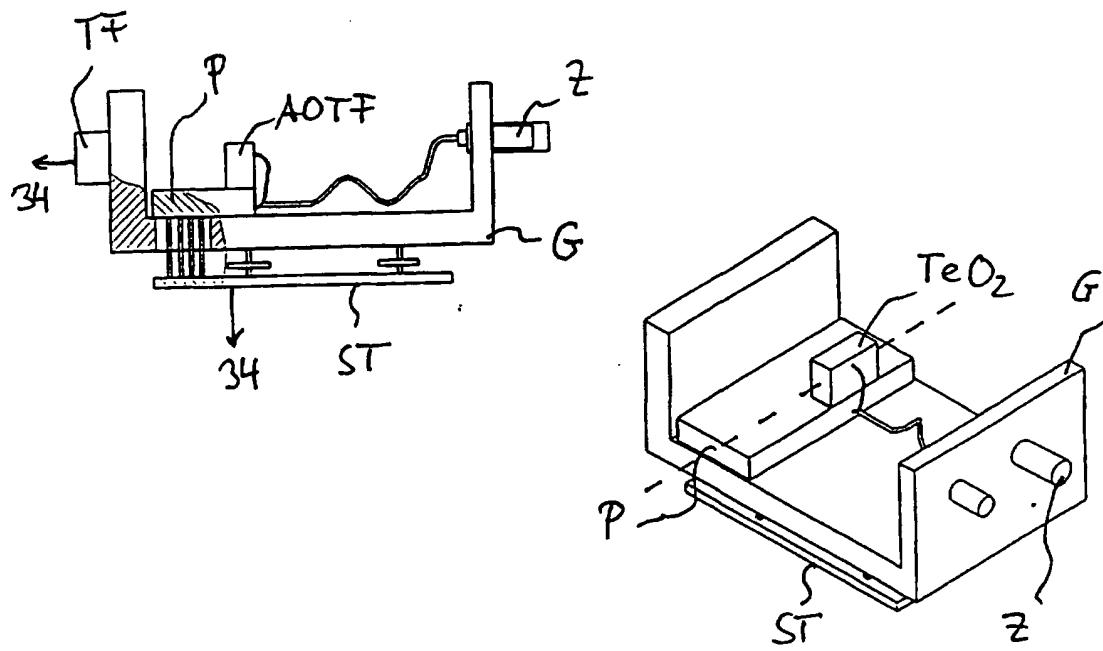


Fig. 2